LA FLORE FONGIQUE DES DRÈCHES BLANCHES DE MAÏS

Béatrice DESPOULAIN, Françoise SEIGLE MURANDI*, Régine STEIMAN et Liliane DEGIORGIS

Laboratoire de Botanique, Cryptogamie, Biologie Cellulaire et Génétique, UFR de Pharmacie, Univ. Joseph Fourier, BP 138, 38423 Meylan, France.

RÉSUMÉ - 22 contaminants fongiques sont isolés à partir des drèches blanches de maïs en majeure partie cellulosiques. La variation des milieux d'isolement, de la granulométrie et de l'aération du substrat permet de diviser ces contaminants en deux groupes principaux. Les contaminants internes présents dans le maïs dès la récolte et les contaminants externes ou superficiels isolés une à deux fois seulement. *Cladosporium herbarum* et *Monascus ruber* sont les principaux contaminants internes. Moins fréquents, *Epicoccum purpurascens, Aspergillus terreus* et *Penicillium glabrum* ne se développent qu'en présence d'oxygène. Le second groupe comprend essentiellement des moisissures des genres *Penicillium* et *Aspergillus*.

ABSTRACT - Twenty two fungal strains have been isolated from mainly cellulosic corn white draff. The use of various isolation media, of various granulometries of the substrate, of various aeration conditions allow to classify the contaminants into two main groups : internal contaminants present in the corn since harvest and external contaminants isolated only once or twice. *Cladosporium herbarum* and *Monascus ruber* are the main internal contaminants. *Epicoccum purpurascens, Aspergillus terreus* and *Penicillium glabrum* are less frequent and develop only in the presence of oxygen. The second group contents mainly molds of genus *Penicillium* and *Aspergillus*.

MOTS CLÉS : Maïs, drèches blanches, contaminants fongiques.

INTRODUCTION

La composition chimique du maïs, céréale oléagineuse, pauvre en cellulose est stable, quelle que soit la variété, le lieu de production ou l'année. C'est une des raisons qui justifie sa présence dans les rations industrielles. En 1981-1982, 21 millions de tonnes de maïs ont été commercialisées

---

* Auteur correspondant

dans la CEE: 15,2 ont été utilisées pour l'alimentation animale et 6,2 millions ont été transformées par les industries de l'amidonnerie, de la semoulerie et de la distillerie (Association Générale des Producteurs de Maïs, 1983). Tandis que les deux premières sont importantes en Europe, la troisième est surtout développée au Royaume Uni (whisky écossais).

L'amidonnerie fait partie des industries qui, à partir d'une matière riche en cet hydrate de carbone, l'amidon, le séparent et le purifient. Les matières premières utilisées sont surtout des céréales comme le maïs. Le lait d'amidon extrait doit être très pur, dépourvu de protéines et d'huile car il représente le produit de base de toute la chaîne industrielle. L'extraction de ces différents constituants est aujourd'hui complète, un minimum d'amidon est "perdu" dans les drèches consommées en alimentation animale. Les producteurs d'aliments pour animaux additionnent souvent celles-ci de "Corn steep" riche en sucre, sels minéraux et protéines. L'ensemble forme le "Corn gluten feed" produit de substitution des céréales. La demande croissante en protéines à la fin du XXème siècle ne peut être satisfaite seulement par l'intensification des cultures ou de l'élevage. Des sources de protéines non conventionnelles doivent être explorées pour couvrir une partie de ces besoins. Les "Single Cell Protein" forment une source d'importance considérable. Elles représentent les cellules d'algues, de bactéries ou de champignons cultivées pour leur contenu protéique (Bisaria & Madan, 1983). L'analyse des drèches de maïs a été réalisée dans le cadre de travaux visant à enrichir ce substrat en protéines d'origine fongique en vue d'une utilisation du produit final dans l'alimentation animale. L'incorporation du produit obtenu dans les aliments pour animaux nécessite l'absence de mycotoxines et par conséquent l'absence de souches susceptibles d'être productrices de ces toxines.

Au cours de ce travail, nous avons étudié les "drèches blanches" de maïs composées de la fraction cellulosique du "grain" isolée à l'occasion de la séparation de l'amidon. Nous nous sommes intéressés à la méthode d'obtention de ces drèches ainsi qu'à leur composition avant de les soumettre à une analyse microbiologique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Méthodes d'obtention

Le sous-produit industriel étudié a été fourni par les établissements Roquette, une des deux amidonneries du Nord de la France localisée à Lille. Ils traitent industriellement 2500 tonnes de maïs par jour venant du Sud Ouest de la France.

Tableau I - Analyse des drèches blanches.
Table I - Analysis of corn white draff.

Constituants		Etablissements Roquette	Despoulain et al.
Perte à la dessication	%	3,80	9,50
Résidu à la calcination	%	0,25	2,52
Azote total	%		10,36
Azote protéique	%	8,70	8,14
Amidon	%	20,20	
Hemicellulose	%	52,30	
Cellulose	%	16,00	
Lignine	%	0,80	
Lipides totaux	%	2,50	
pH drèches stérilisées			4,05
pH drèches non stérilisées		4,30	4,19

Les grains sont trempés dans une solution d'anhydride sulfureux pendant 30 à 48h à une température de 50 à 52°C. Cette solution permet de transformer les sucres réducteurs en acide lactique. Les eaux de trempage chargées de toutes les particules solubles (sucres, sels minéraux, protéines et acide lactique) sont séparées puis concentrées par évaporation sous vide pour former le "corn steep" ou soluble de maïs. Le grain, ramolli par le trempage, subit un broyage grossier qui le fait éclater en libérant le germe sans le briser. Les germes séparés des autres constituants du grain sont lavés, séchés, puis pressés pour en extraire l'huile brute. Le tourteau résiduel est destiné à l'alimentation animale.

La suspension comprenant l'amidon, les protéines et les fibres cellulosiques est très finement broyée. Ce mélange subit ensuite deux tamisages: le premier sépare les enveloppes les plus grosses, le second les fines particules. Les enveloppes lavées et séchées sont appelées "drèches". L'amidon et les protéines sont séparés par centrifugation.

Composition

L'analyse des drèches blanches obtenues en amidonnerie est présentée dans le tableau I. Elles sont riches en hémicellulose (52,3%) et cellulose (16%). Elles ne contiennent que 8,14% de protéines. Leur teneur en amidon est encore de 20,2%.

Analyse microbiologique

1 à 2g de drèches en poudre ou 2 à 3g en granulés sont mis en présence de 4 milieux de cultures différents, soit déposés à la surface du milieu, soit

introduits dans la boîte de Pétri avant de couler le milieu selon la méthode de "Warcup" (Warcup, 1960).

Les milieux de culture utilisés sont: a) milieu gélosé à base d'extrait de malt (MEA): il contient 15g d'agar et 15g d'extrait de malt pour 1 litre de milieu, pH = 5. b) le même milieu additionné de chloramphénicol (500mg/l) (MEAc), pH = 5. c) milieu de Galzy & Slonimski (1957) (GS), gélosé avec 15g d'agar par litre, pH = 4,5. d) milieu pomme de terre, glucose, agar (Difco) (PDA), pH = 5,6.

Ces milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn et répartis en boîtes de Pétri (90mm). Après ensemencement des drèches, les cultures sont incubées à 24°C en vue d'obtenir un bon développement des contaminants. Chaque contaminant isolé et identifié est conservé en tube sur milieu à base d'extrait de malt à 4°C. Chaque essai est réalisé en 3 exemplaires.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les contaminants isolés des drèches blanches sont regroupés dans le tableau II, représentant respectivement les isolements réalisés à partir des 4 milieux utilisés: MEA, MEAc, GS, PDA à la surface de la gélose et en "Warcup".

Le tableau nous indique pour les 4 milieux: - le nom de chaque contaminant, - sa présence ou non sur les drèches en poudre, - sa présence ou non sur les drèches en granulés, - sa fréquence d'apparition par rapport au nombre de boîtes ensemencées (3).

Pour faciliter l'expression des résultats, nous pouvons diviser les contaminants en 3 grands groupes (Tabl. III) selon le nombre d'observations faites de chaque contaminant sur un milieu donné: - micromycètes peu fréquents: observés une fois, - micromycètes assez fréquents: observés deux fois, - micromycètes très fréquents: observés trois fois et plus. Ces observations sont réalisées sans tenir compte de la granulométrie du solvant. Nous constatons que la majeure partie des micromycètes n'est observée qu'une fois sur un même milieu à l'exception de 6 moisissures observées 2 fois et 6 moisissures observées 3 fois et plus.

Les pH des 4 milieux utilisés sont très proches. Ils vont de 4,5 pour le milieu GS à 5,6 pour le milieu PDA. Ces pH faiblement acides conviennent à la grande majorité des micromycètes. Les milieux MEA, MEAc et PDA à base de malt ou d'amidon sont riches par rapport au milieu GS contenant seulement des éléments minéraux et une seule source de carbone.

	drèches en Poudre								drèches en granulés							
	Surface				Warcup				Surface				Warcup			
	MEA	MEAc	GS	PDA	MEA	MEAc	GS	PDA	MEA	MEAc	GS	PDA	MEA	MEAc	GS	PDA
Aspergillus amstelodami (Mangin) Thom & Church										1						
Aspergillus chevalieri (Mangin) Thom & Church		1			2					1				1	1	1
Aspergillus echinulatus (Delacr.) Thom & Church					1											
Aspergillus flavus var columnaris Link:Fr./Raper & Fennell				1										2		
Aspergillus manginii Thom & Raper							1									1
Aspergillus niger van Tieghem				1												
Aspergillus repens (de Bary) Fischer														1		
Aspergillus terreus Thom		1									1					
Aspergillus terreus var aureus Thom/Thom & Raper				3						1		2				
Basidiomycètes						1	1									
Cladosporium herbarum (Pers.:Fr.) Link		1	2	1		1			1		1					1
Epicoccum purpurascens Ehrenb.			3	1					2			1				
Monascus ruber van Tieghem					3	3	2			1	3			3	3	2
Paecilomyces variotii Bain.	1															
Penicillium aurantiogriseum Dierckx		2							1							
Penicillium brevicompactum Dierckx			3													
Penicillium claviforme Bain.	1	1														
Penicillium corylophilum Dierckx		1														1
Penicillium crustosum Thom	1															
Penicillium glabrum (Wehmer) Westling	2		1	1					1							
Penicillium hirsutum Dierckx	1															
Penicillium pinophylum Hedgecock	1															

Tableau II: Récapitulatif des contaminants fongiques isolés des drèches blanches de Maïs. 1: micromycète peu fréquent, 2: micromycète fréquent, 3: micromycète très fréquent.

Table II: Récapitulation of the various fungal strains contaminaiting corn white draff.

	Micromycètes peu fréquents	Micromycètes assez fréquents	Micromycètes très fréquents
milieu MEA Surface	Cladosporium herbarum Paecilomyces variotii Penicillium aurantiogriseum Penicillium claviforme Penicillium crustosum Penicillium hirsutum Penicillium pinophylum	Epicoccum purpurascens	Penicillium glabrum
WARCUP	Aspergillus echinulatus	Aspergillus chevalieri	Monascus ruber
milieu MEAc Surface	Aspergillus amstelodami Aspergillus terreus v. aureus Aspergillus terreus Cladosporium herbarum Monascus ruber Penicillium claviforme Penicillium corylophilium	Aspergillus chevalieri Penicillium aurantio-griseum	
WARCUP	Aspergillus chevalieri Aspergillus repens Basidiomycète Cladosporium herbarum	Aspergillus flavus var columnaris	Monascus ruber
milieu GS Surface	Aspergillus terreus Penicillium glabrum		Cladosporium herbarum Epicoccum purpurascens Monascus ruber Penicillium brevicompactum
WARCUP	Aspergillus chevalieri Aspergillus manginii Basidiomycète		Monascus ruber
milieu PDA Surface	Aspergillus flavus var columnaris Aspergillus niger Cladosporium herbarum Penicillium glabrum	Epicoccum purpurascens	Aspergillus terreus var aureus
WARCUP	Aspergillus chevalieri Aspergillus manginii Cladosporium herbarum Penicillium corylophilum	Monascus ruber	

Tableau III: Fréquence des contaminants sur les différents milieux de culture.

Table III: Occurrence of contaminants on each culture medium.

Spécificité de la souche pour le milieu

Cinq souches sont isolées régulièrement sur 3 ou 4 des milieux utilisés: *Aspergillus chevalieri*, *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum purpurascens*, *Monascus ruber* et *Penicillium glabrum*. Dans l'ensemble, les autres souches n'ont été isolées qu'à partir d'un seul milieu de culture.

Influence de la granulométrie du substrat [redacted] la pousse des contaminants

Les souches qui apparaissent dans les drèches en granulés ont du mal à se développer car leurs conidies sont enfermées à l'intérieur des granulés. Elles manquent d'oxygène pour leur germination. Elles présentent des difficultés de croissance car elles ne sont pas directement en contact avec le milieu nutritif. Le manque de place et la faible humidité relative vont engendrer une faible proportion de germination des conidies. Ces dernières devront donc être nombreuses pour que le contaminant se développe. Les souches qui se développent dans les drèches en granulés seront appelées des contaminants "internes" ce qui signifie qu'elles sont présentes dans le substrat depuis le stockage des grains de maïs ou même au champ avant la récolte. Les autres contaminants isolés une à deux fois au maximum, et à partir de drèches en poudre sont appelés contaminants "externes" ou superficiels des drèches. Ils peuvent avoir contaminé le substrat "accidentellement" au cours du transport.

Parmi les moisissures isolées sur plusieurs milieux de culture, aucune ne s'est développée sur les drèches en poudre sans se développer sur les drèches en granulés et inversement.

Influence de l'aérobiose et de l'anaérobiose [redacted] le développement des contaminants

A la surface des milieux, les souches se développent en aérobiose. Sous la gélose, la germination des conidies et le début de la phase de croissance s'effectue en anaérobiose. Seules 3 souches se développent exclusivement en aérobiose: *Aspergillus terreus*, *A. terreus* var. *aureus*, *Epicoccum purpurascens*.

Les *Penicillium* isolés n'apparaissent qu'en surface des milieux de culture à l'exception de *Penicillium corylophilum* qui est présent en "Warcup" sur le milieu PDA.

Aspergillus chevalieri, *Cladosporium herbarum* et *Monascus ruber* se développent très bien sur les milieux utilisés; ils sont indifférents à l'absence d'oxygène lors de la germination des conidies et à la granulométrie du substrat. La pousse de ces contaminants dans toutes les conditions essayées met en évidence leur présence en profondeur du substrat. *Epicoccum purpurascens*, *Aspergillus terreus* et *Penicillium glabrum* sont également des contaminants internes aux drèches, mais ne se développent qu'en aérobiose.

Cahagnier & Poisson (1973), en étudiant la microflore des grains de maïs humide en fonction de divers modes de stockage ont observé la dominance du genre *Cladosporium* sur les grains de maïs à la récolte et une pauvreté en *Penicillium* et en *Aspergillus*. Plus xérophiles que le genre précédent, ces moisissures sont susceptibles d'être à l'origine d'une "flore de stockage".

Sur 9 *Aspergillus* isolés, 5 appartiennent au groupe *glaucus*. La nature osmophile des espèces de ce groupe nécessite l'utilisation d'un substrat caractérisé par une forte pression osmotique (Raper et al., 1973). *Aspergillus chevalieri* est présent dans les 4 milieux étudiés en Warcup dont 3 en présence de drèches en granulés et *Aspergillus echinulatus*, *A. manginii* et *A. repens* sont isolés uniquement en condition Warcup. *A. chevalieri* est un très bon utilisateur de glucose, et il a été trouvé dans les grains de maïs moisis (Richard et al., 1969); mais il n'attaque pas les substrats cellulosiques (Reese & Downing, 1951).

Parmi les contaminants internes, *Monascus ruber* van Tiegh et *Cladosporium herbarum* sont les plus fréquents sur les différents milieux utilisés. Le premier, encore appelé *Monascus purpureus* Went, appartient aux Pezizales. La délimitation de cette espèce est mal connue. Cette moisissure est couramment rencontrée dans les aliments à base d'amidon. Différents rapports sur ces 2 noms ont été effectués (Domsch et al., 1980) à propos de souches venant d'une part d'amidonnerie en Afrique du Sud et d'autre part de maïs d'ensilage contaminé par des micromycètes aux USA, en Australie (Cole & Kendrick, 1968) et en France (Moreau, 1971). *Cladosporium herbarum* (Hyphomycètes) est un des premiers colonisateurs des substrats végétaux inertes, en particulier les graines et les feuilles. Son pH de croissance optimum est voisin de celui des milieux utilisés. De nombreux rapports existent sur sa présence dans les graines de céréales (Malone & Muskett, 1964; Moubasher et al., 1972). Il possède une bonne activité amylolytique (Flanagan & Scarborough, 1974) et la décomposition de la cellulose se produit sur les substrats les plus variés. Ces différents renseignements peuvent expliquer son abondance dans les drèches de maïs. *Epicoccum purpurascens* et *Aspergillus terreus* se trouvent tous deux couramment dans les graines et notamment le maïs (Moubasher et al., 1972). Le premier dégrade la cellulose (Moreau et al., 1965); le deuxième la cellulose (Pugh, 1966) et l'amidon (Franz, 1975). La production de gaz carbonique par *A. terreus*, et donc son développement, sont diminués par un substrat dense comme des billes de verre (Parr & Norman, 1964); cela explique son absence de développement en ensemencement "Warcup" où les drèches recouvertes de gélose forment un substrat très compact.

D'après l'étude de Richard et al. réalisée en 1969 sur les champignons toxiques associés au maïs stocké, la majorité des souches toxiques isolées appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Ceux-ci, comme nous l'avons confirmé au cours de cette analyse, n'envahissent pas ou peu les

grains avant la récolte mais plutôt au cours du stockage. Les contaminants internes comme *Monascus ruber*, *Epicoccum purpurascens*, *Cladosporium herbarum* et *Aspergillus chevalieri* ne sont pas cités comme des producteurs majeurs de mycotoxines.

En conclusion, l'analyse des drèches de maïs sous forme de poudre et de granulés a permis de discerner les contaminants "internes" des contaminants "externes". Le milieu malt chloramphénicol, milieu le plus riche inhibant les bactéries, permet d'isoler 14 des 22 micromycètes détectés dans les drèches. Les autres milieux confirment et complètent cette analyse microbiologique.

Le nombre restreint de contaminations liées à un substrat peu hydraté (9,5%) et la faible proportion de souches susceptibles de produire des mycotoxines dans les drèches non stérilisées engagent à entreprendre une valorisation de celles-ci par enrichissement protéique en vue de l'utilisation alimentaire animale.

BIBLIOGRAPHIE

Association Générale des Producteurs de Maïs - Les industries du Maïs, 1983.

BISARIA R. and MADAN M., 1983 - Mushrooms: potential protein source from cellulosic residues. *Enzyme Microbiol. Technol.* 5: 251-259.

CAHAGNIER B. et POISSON J., 1973 - La microflore des grains de maïs humide: composition et évolution en fonction de divers modes de stockage. *Rev. Mycol. (Paris)* 38: 23-42.

COLE G.T. and KENDRICK W.B., 1968 - Conidium ontogeny in hyphomycetes. The imperfect state of *Monascus ruber* and its meristem arthrospores. *Canad. J. Bot.* 46: 987-992.

DOMSCH K.H., GAMS W. and ANDERSON T., 1980 - *Monascus* van Tiegh. 1884. *In*: DOMSCH et al., *Compendium of soil fungi*, vol. 1, Academic Press, 425-426.

FLANAGAN P.W. and SCARBOROUGH A.M., 1974 - Physiological groups of decomposer fungi on tundra plant remains. *In*: HOLDING A.J. et al., *Soil organisms and decomposition in tundra.* Stockholm, Tundra Biome steering committee, 159-181.

FRANZ G., 1975 - Temperaturanspruecke Mikroskopischer Bodenpilze aus klimatisch. und Geographisch.verschiedenen standaten. *Z. Pflernachr. Bodenk.* 1: 73-87.

GALZY P. et SLONIMSKI P., 1957 - Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, Sér. D, 245: 2423-2426.

MALONE J.P. and MUSKETT A.E., 1964 - Seed-Borne Fungi. Descriptions of 77 fungus species. *Proc. Int. Seed Testing Assoc.* 29/2: 179-384.

MOREAU C., MOREAU M. et PELHATE J., 1965 - Comportement cultural de moisissures du blé en relation avec leur écologie sur grains. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, sér. D, 260: 1229-1322.

MOREAU C., 1971 - Présence du *Monascus purpureus* Went dans du maïs ensilé. Remarques sur la forme imparfaite *Basipetospora*. *Bull. Soc. Mycol. France* 87: 39-44.

MOUBASHER A.H., ELNAGHY M.A. and ABDEL-HAFEZ S.I., 1972 - Studies on the fungus flora of three grains in Egypt. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 47: 261-274.

PARR J.F. and NORMAN A.G., 1964 - Growth and activity of soil microorganisms in glass microbeads. 1. carbon dioxide evolution. *Soil Sci.* 97: 361-366.

PUGH G.J.F., 1966 - Cellulose-decomposing fungi isolated from soils near madras. *J. Indian Bot. Soc.* 45: 232-241.

RAPER K.B., FENNELL D.I. and AUSTWICK P.K.C., 1973 - *Aspergillus glaucus* group. *In:* RAPER K.B. et al., *The genus Aspergillus*. New York, R.E. Krieger Publ. Comp. Huntington, 147-189.

REESE E.T. and DOWNING M.H., 1951 - Activity of the Aspergilli on cellulose, cellulose derivatives, and wool. *Mycologia* 43: 16-28.

RICHARD J.L., TIFFANY L.H. and PIER A.C., 1969 - Toxigenic fungi associated with stored corn. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 38: 313-326.

WARCUP J.H., 1960 - Methods for isolation and estimation of activity of fungi in soil. *In: The Ecology of Soil Fungi*. Liverpool, Int. Symp. Univ. Press, 3-21.